

## 【総説】

## 第9回 高安賞優秀賞受賞論文

論文 「Inducible Costimulator Ligand (ICOSL) Regulates Bleomycin-induced Lung and Skin Fibrosis Independently of the ICOS-ICOSL Pathway」  
Arthritis & Rheumatism

Vol. 62, Page1723-32 2010年6月掲載

田中千洋, 藤本 学, 濱口儒人, 佐藤伸一, 竹原和彦,  
長谷川稔 共著ICOSLは、ICOS-ICOSL経路非依存性に、ブレオマイシンにより  
誘導される皮膚・肺の線維化を制御する

田中 千洋 (たなか ちひろ)

## 背 景

全身性強皮症は、皮膚および内臓諸臓器の線維化により特徴づけられる膠原病の一つであり、肺線維症は強皮症患者の主な死因である。その病態はいまだ不明であるが、組織に浸潤したリンパ球やマクロファージから産生されるサイトカインが、線維芽細胞からのコラーゲン産生を異常に亢進させていると考えられている。ブレオマイシン (BLM) は抗腫瘍性抗癌剤の一種であるが、マウスへの1回の気管支内投与により肺線維症を、連日の皮内注射で局所の皮膚硬化 (高容量では肺線維症も) を生じることが知られており、強皮症の有用なモデルとして使用される。Inducible costimulator (ICOS) は、CD28ファミリーに属する共刺激分子で、ICOSとICOSLは現在知られる唯一のリガンド同士である<sup>2)3)</sup>。ICOSはT細胞のみに発現するが、ICOSLは樹状細胞、B細胞、マクロファージだけでなく、線維芽細胞や肺胞上皮細胞、血管内皮細胞などにも発現するという報告もある。ICOS-ICOSL経路は、T細胞の活性化、分化、Th2サイトカインの産生などを介したエフェクター作用を促すとされている。強皮症におけるICOSとICOSLの関与を検討するため、ICOSやICOSLを欠損したマウスを使用し、BLM誘導性肺線維症や皮膚硬化<sup>4)</sup>におけるICOS、ICOSLの役割について検討した。

## 結 果

1) BLM気管支内投与による肺線維症の誘導：C57BL/6バックグラウンドの野生型 (WT; wild type) マウス、ICOS<sup>-/-</sup>マウス、ICOSL<sup>-/-</sup>マウスにBLM 8 mg/kgを気管支内に投与し、21日後の肺を採取し判定した。ICOS<sup>-/-</sup>マウスでは野生型に比較して生存率は高く (図1A)、肺の線維化は軽度であったが、反対にICOSL<sup>-/-</sup>マウスでは生存率は低く、線維化は重症であった。

2) BLM皮内投与による皮膚硬化、肺線維症の誘導：同様に、BLM 300  $\mu$ l (1mg/ml)を4週間連日皮内投与した。BLM気管支投与と同様に、皮膚・肺ともにICOS<sup>-/-</sup>マウスで線維化は軽減、ICOSL<sup>-/-</sup>マウスで線維化は増強していた (図1B)。肺・皮膚の細胞浸潤ではICOS<sup>-/-</sup>マウスでマクロファージ、B細胞、T細胞、好中球の浸潤が野生型マウスに比べ少ないのに対し、ICOSL<sup>-/-</sup>マウスでは、マクロファージ、B細胞、T細胞、好中球の浸潤が増加していた。BLM投与後の肺では、ICOS<sup>-/-</sup>マウスでTGF- $\beta$ のmRNAの発現が減少し、ICOSL<sup>-/-</sup>マウスでは有意に亢進していた (図2)。肺組織抽出液中のTNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ を、ELISA法やcytometric bead array法で測定したが、野生型マウスと比べ、ICOS<sup>-/-</sup>マウス、ICOSL<sup>-/-</sup>マウスで有意な差は認めなかった。

3) ICOSとICOSLの両方を欠損したマウスにおける、BLM誘導性皮膚硬化、肺線維症の評価：ICOSとICOSLは同様の表現型を示すと考えられている<sup>5)</sup>が、異なった結果が得られたため、ICOS<sup>-/-</sup>ICOSL<sup>-/-</sup>マウスを作成し検討した。ICOS<sup>-/-</sup>ICOSL<sup>-/-</sup>マウスではICOSL<sup>-/-</sup>マ

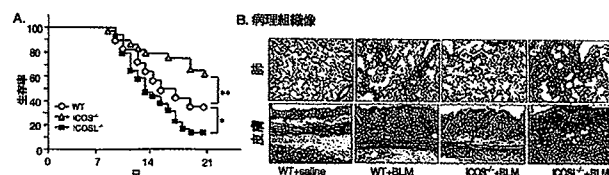


図1. A) BLM気管支内投与後の生存曲線。野生型 (WT) マウスにくらべ、ICOS<sup>-/-</sup>マウスで生存率が改善したが、ICOSL<sup>-/-</sup>マウスでは生存率が低下した。B) BLM連日皮内投与による肺・皮膚の病理組織学的変化 (肺: Masson's trichrome染色, 皮膚: Azan-Mallory染色)。野生型にくらべICOS<sup>-/-</sup>マウスで線維化が軽度であるのに対し、ICOSL<sup>-/-</sup>マウスでは線維化が増強していた。\*, P<0.05; \*\*, P<0.01。

ウスと同様に生存率は低下し、皮膚・肺の線維化は重症化し、炎症細胞浸潤も増加、肺におけるTGF- $\beta$ のmRNAの発現も亢進していた(図3)。

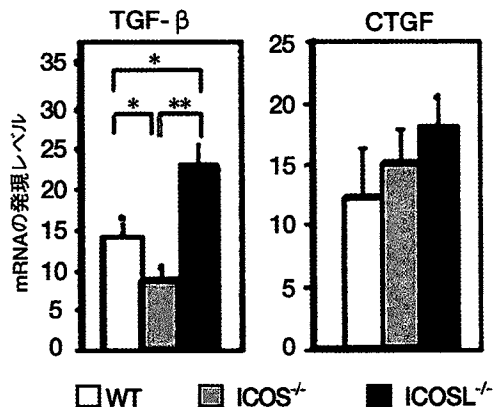
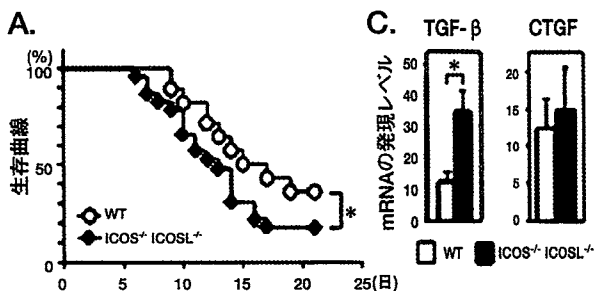


図2. BLM気管支内投与後の肺におけるサイトカインのmRNAの発現。Real time PCRで測定したTGF- $\beta$ の発現は、ICOS<sup>-/-</sup>マウスで有意に低下し、ICOSL<sup>-/-</sup>マウスで有意に亢進していた。\*, P<0.05; \*\*, P<0.01。



#### B. 病理組織像 (ICOS<sup>-/-</sup> ICOSL<sup>-/-</sup> + BLM)



図3. ICOS<sup>-/-</sup>ICOSL<sup>-/-</sup>マウスにおける検討結果。A) BLM気管支内投与後の生存率、B) 連日皮内投与による肺・皮膚の病理組織学的変化(肺: Masson's trichrome染色, 皮膚: Azan-Mallory染色)とC) 肺組織中のTGF- $\beta$ の発現は、いずれもICOSL<sup>-/-</sup>マウスと同様の傾向を示した。\*, P<0.05。

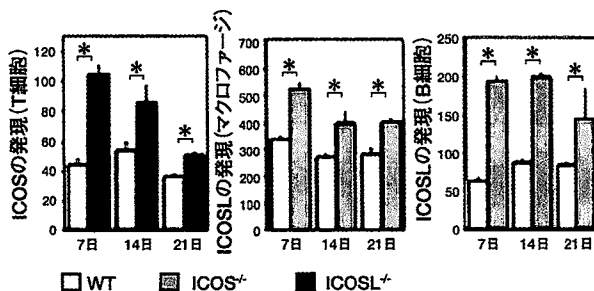


図4. フローサイトメトリーによる気管支肺胞洗浄液中の細胞のICOS, ICOSLの発現。BLM投与7日目ピークにICOS, ICOSLの発現が亢進し、ICOS<sup>-/-</sup>マウスではマクロファージやB細胞上のICOSLの発現が、ICOSL<sup>-/-</sup>マウスではT細胞上のICOSの発現が著明に亢進していた。\*, P<0.05。

4) フローサイトメトリーによるBLM気管支投与後の気管支肺胞洗浄液におけるICOS, ICOSLの発現の解析: ICOS<sup>-/-</sup>マウスでは、マクロファージ、B細胞でのICOSLの発現が野生型マウスに比べ著明に増加していた。対照的に、ICOSL<sup>-/-</sup>マウスでは、T細胞でのICOSの発現が有意に増加していた。

#### まとめ

このように、BLM投与により誘導される肺線維症・皮膚硬化の重症度は、T細胞におけるICOSの発現ではなく、マクロファージやB細胞におけるICOSLの発現量と逆相関していた。これまでに、ICOSとICOSLは1:1のリガンド同士と考えられてきた。しかし、今回の結果からは、ICOSLがICOS以外にもリガンドとして働き、しかもBLMモデルにおいては、その線維化を抑制する経路がICOS-ICOSLの線維化促進の経路よりも優勢に働く可能性がひとつには考えられる。もうひとつの考え方としては、BLMモデルにおいて、抗原提示細胞上のICOSLの発現自体が、ICOS-ICOSL経路を介さずに抗原提示細胞の線維化に影響するシグナル閾値を抑制するというものである。他の可能性も含めて、今後の検討が必要と考えられる。

BLMによる肺、皮膚の線維化においては、ICOSLが、ICOS-ICOSL経路を介さない役割を有することが示された。この結果から、強皮症の病態形成にもICOS, ICOSLが関与している可能性があると考えられた。

#### 文 献

- Gabrieli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. N Engl J Med 360: 1989-2003, 2009.
- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. Nature 397: 263-6, 1999.
- Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. Nature 402: 827-32, 1999.
- Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. J Invest Dermatol. 112: 456-462, 1999.
- Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ, Dong C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 14163-8, 2003.

#### Profile

所 属 金沢大学大学院医学系研究科結合組織代謝学

2000年: 金沢大学医学部卒業

2010年: 金沢大学大学院医学系研究科卒業

